

ФОСФАТАЗОПОЗИТИВНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОЖИ КРЫС ПРИ ЕЕ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ НАНЕСЕНИЯ РАНЫ

МЯДЕЛЕЦ О.Д.¹, ЛЕБЕДЕВА Е.И.¹, МЯДЕЛЕЦ Н.Я.²

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

²Витебский государственный медицинский колледж, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №3. – С. 44-57.

PHOSPHATASE-POSITIVE STEM CELLS OF RAT SKIN WHILE ITS POSTTRAUMATIC REGENERATION IN DIFFERENT CONDITIONS OF WOUND INFLECTING

MYADELETS O.D.¹, LEBEDEVA E.I.¹, MYADELETS N.Y.²

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

²Vitebsk State Medical College, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2018;17(3):44-57.

Резюме.

Кожа млекопитающих при ранении регенерирует с образованием рубца. Органотипическая регенерация с полным восстановлением исходного строения кожи удавалась в немногочисленных экспериментальных условиях. Механизмы формирования органотипических регенератов не изучены.

Цель исследования – изучение с помощью фермента щелочной фосфомоноэстеразы (ЩФ) стволовых клеток кожи (СК) и характер их изменений при органотипическом заживлении кожных ран, нанесенных при пролонгированной глубокой гипотермии.

Материал и методы. Для работы использованы 114 половозрелых белых крыс, обоего пола, которым раны наносили в состоянии нормотермии и на глубине гипотермии. Для достижения общей глубокой гипотермии после наркотизации этиловым эфиром животных охлаждали с помощью смеси «вода-лед» до ректальной температуры +18°C. Далее в межлопаточной области наносили полнослойные штампованные раны диаметром 1 см, и состояние гипотермии продлевали на 6 ч. Затем животных согревали со скоростью 1°C за 4-5 мин. Контрольным животным аналогичные раны наносили при нормотермии. Кожу межлопаточной области у интактных крыс и регенерат с окружающей его кожей у экспериментальных животных брали сразу после охлаждения и в разные сроки после согревания, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Из замороженного в жидком азоте материала готовили криостатные срезы, в которых выявляли ЩФ по методу Берстона.

Результаты и заключение. Нанесение раны кожи на фоне пролонгированной глубокой гипотермии приводит к формированию регенерата кожного типа с восстановлением волос и сальных желез. В эпителизации поверхности раны и последующем формировании дериватов кожи ведущая роль принадлежит СК эпителия утолщения (bulge) волосных фолликулов кожи, окружающей рану. Происходит увеличение количества и активности ЩФ в СК bulge, эти клетки распространяются в сторону межфолликулярного эпидермиса. В нем начинают выявляться ЩФ-позитивные клетки, дающие на всем протяжении резко позитивную реакцию на фермент. Вокруг волосных фолликулов кожи, окружающей рану, появляется ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс. Содержащаяся в нем щелочная фосфомоноэстераза, очевидно, может содействовать органотипической регенерации кожи.

Ключевые слова: кожа, раны, гипотермия, ЩФ-позитивные стволовые клетки.

Abstract.

When injured the skin of the mammals regenerates with scar formation. Organotypic regeneration with complete restoration of the original structure of the skin was successful in not numerous experimental conditions. The mechanisms

of the formation of organotypic regenerates have not been studied.

Objectives. To study with the help of the enzyme of alkaline phosphomonoesterase (AP) the stem cells of the skin (SC) and the nature of their changes in the organotypic healing of skin wounds inflicted with prolonged deep hypothermia.

Material and methods. For this investigation, 114 mature white rats of both sexes were used, whose wounds were inflicted in the state of normothermia and at the depth of hypothermia. To achieve general deep hypothermia, after anesthesia with ethyl ether, the animals were cooled with a «water-ice» mixture up to the rectal temperature of $+18^{\circ}\text{C}$. Further in the interscapular area, full-thickness stamped wounds with a diameter of 1 cm were inflicted, and the hypothermia condition was prolonged by 6 hours. Then the animals were warmed at a speed of 1°C per 4-5 minutes. Control animals were wounded similarly on normothermia. The skin of the interscapular region in intact rats and the regenerate with surrounding skin in experimental animals were taken immediately after cooling and at various times after warming, poured into paraffin, the sections were stained with hematoxylin-eosin. Cryostat sections were prepared from the frozen in liquid nitrogen material, in which AP was detected by the Burstone method.

Results and conclusions. The skin wounding against the background of prolonged deep hypothermia leads to the formation of the skin type regenerate with the restoration of hair and sebaceous glands. In the epithelization of the wound surface and the subsequent formation of the skin derivatives, the leading role is played by the SC epithelium of thickening (bulge) of the hair follicles of the skin surrounding the wound. There is an increase in the amount and activity of AP in the SC of the bulge, these cells extend towards the interfollicular epidermis. It starts to reveal AP-positive cells, which give an over-all sharply positive reaction to the enzyme. Around the hair follicles of the skin surrounding the wound, an AP-positive extracellular matrix appears. The alkaline phosphomonoesterase contained in it can obviously contribute to the organotypic regeneration of the skin.

Key words: skin, wounds, hypothermia, AP-positive stem cells.

Внешний покров млекопитающих имеет одну особенность, не устраивающую травматологов и косметологов. Эта особенность связана с невозможностью его органотипической регенерации при распространенных повреждениях. Даже относительно небольшие раны кожи заживают по типу тканетипической регенерации, когда эпидермис и соединительная ткань регенерируют достаточно быстро, но при этом образуется соединительнотканый рубец, а другие органы общего покрова (волосы и железы) не восстанавливаются. Отсутствует также разделение дермы на сосочковый и сетчатый слои [1, 2]. Это создает дополнительные проблемы как для косметологов, так и для пациентов. Для получения органотипических регенератов проводились многочисленные исследования, однако большинство из них завершилось неудачами. В работах Е.А. Ефимова и соавт. [3, 4] показано, что в некоторых случаях (введение антиоксиданта дибунола, воздействие на регенерат длительными механическими повреждающими факторами) можно добиться возникновения регенерата кожного типа, т.е. органотипической регенерации. Однако результаты оказались непостоянными, и часто формировался регенерат дермального типа, т.е. соединительнотканый рубец, иногда существенно деформирующий кожу. Механизмы формирования органотипических регенератов, равно как и причины

неудач, ни авторами процитированных работ, ни другими исследователями не изучались.

В собственных работах при нанесении раны в условиях общей глубокой пролонгированной гипотермии регенераты кожного типа формировались у всех животных. Была сделана попытка объяснения данного феномена [5-10]. Однако в годы, соответствующие выполнению эксперимента (1987-1993), было недостаточно литературных сведений, и некоторые явления не были объяснены. В частности, непонятны были особенности и характер распределения активности в структурах кожи фермента щелочной фосфомоноэстеразы (ЩФ).

В функциональных отправлениях и при регенерации кожи большое значение имеют стволовые клетки эпидермиса (СКЭ). Изучение их затруднено из-за отсутствия надежных критериев. Одни лишь рутинные морфологические методы исследования не могут позволить достоверно установить указанные клетки. В этом отношении более достоверными являются иммуногистохимические методы с выявлением цитокератинов K5, K14, K19, белков Ki67 и p63. Белок p63 является транскрипционным фактором и экспрессируется не только стволовыми кератиноцитами, но и частью транзитных клеток. Он относится к семейству белков, куда входят также белки p53 и p73. Белки этого семейства способны вызывать

остановку митотического цикла клетки и в последующем ее апоптоз [11]. Pellegrini e.a. (2001) [12] предположили, что белок p63 является маркером эпидермальных СКЭ и участвует в морфогенезе эпидермиса, в частности, необходим для начала образования его слоев, т.е. для стратификации. Изоформы белка p63 участвуют также в поддержании целостности базальной мембраны и формирования шиповатого слоя эпидермиса. Следует отметить, что иммуногистохимические методы исследования не всегда доступны, достаточно сложные и дорогостоящие.

Одним из показателей тотипотентности эмбриональных стволовых клеток и плюрипотентности стромальных стволовых клеток является фермент щелочная фосфомоноэстераза (ЩФ) [13]. Установлено, что при культивировании стволовые клетки секретируют в культуральную среду щелочную и кислую фосфомоноэстеразы, а также другие факторы. ЩФ является наиболее точным маркером стволовых клеток. Поэтому в коже максимальная экспрессия этого фермента определяется в раннем анагене. Он является индикатором индукционной способности дермального сосочка, а также эпидермиса и эпителия волосяного фолликула. Однако в культуре клеток со временем многие белки, характерные для интактных клеток дермального сосочка, в том числе и ЩФ, практически не определяются, и индукционный потенциал клеток исчезает. Это связывают с изменением клеточного микроокружения в культуре ткани. Очевидно, это же происходит и *in vivo* по мере завершения в коже морфогенетических процессов.

Целью настоящего исследования явилось изучение с помощью фермента щелочной фосфомоноэстеразы СКЭ и характер их изменений в коже белых крыс в процессе заживления кожных ран, нанесенных при нормотермии и при пролонгированной 6-часовой гипотермии.

Материал и методы

Материал для настоящего исследования получен в ходе выполнения экспериментов в период времени с 1987 по 1993 г. и в последующем был недостаточно полно оценен и не использован в полной мере. Поэтому возникла необходимость вернуться к нему и рассмотреть его с точки зрения интенсивно развивающегося в последние десятилетия учения о стволовых клетках кожи и их роли в регенераторном процессе. Материал был

задокументирован, зафотографирован и заархивирован. Ранее материал в данном аспекте не был опубликован.

Для работы были использованы 114 половозрелых белых беспородных крыс обоего пола: 6 – интактные животные; 54 – животные, которым раны наносили в состоянии нормотермии; 54 – животные, которым рану наносили на глубине общего охлаждения организма.

Для достижения общей глубокой гипотермии у белых половозрелых крыс использовали собственную методику, подробно описанную ранее [14]. Для этого под эфирным наркозом животных охлаждали с помощью смеси «вода-лед» со скоростью 1°C за 4-5 мин до ректальной температуры +18°C. Охлаждение производили на полиэтиленовой пленке, которой накрывали ванночку с указанной выше смесью. После достижения в прямой кишке температуры +18°C животным в межлопаточной области с помощью специального пробойника наносили полнослойные штампованные раны диаметром 1 см, а затем состояние гипотермии продлевали на 6 ч. Далее животных медленно, со скоростью 1°C за 4-5 мин, согревали при помощи лампы-рефлектора. Весь эксперимент продолжался 10 ч. Контрольным животным аналогичные раны наносили в состоянии нормотермии. Животных декапитировали под эфирным наркозом после достижения ректальной температуры +18°C, сразу после согревания, а также через 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 сут после завершения эксперимента.

Материалом для исследования явились полнослойные лоскуты кожи межлопаточной области у интактных контрольных крыс, а также ткани регенерата и окружающая его кожа у экспериментальных животных. Образцы кожи разрезали на две части. Одну часть помещали на полоску фильтровальной бумаги, к которой кожа в силу адгезивных свойств соединительной ткани прочно прилипала, маркировали и помещали в фиксатор Буэна на 24 ч. Из этой части образцов готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином-эозином. Вторую часть образцов вместе с маркировочной полоской фильтровальной бумаги заворачивали в тонкую фольгу и помещали в сосуд Дьюара с жидким азотом (температура жидкого азота составляет -190°C). Замороженный материал переносили в криостат, где готовили срезы толщиной 10 мкм, помещали их на предметные стекла и фиксировали нанесением на них нескольких капель аце-

тона. ЩФ выявляли методом азосочетания по М. Берстону с использованием фосфата нафтола AS-MX и прочного синего RR. Интенсивность внераневого вставочного роста изучали методом тушевых меток, контракции краев раны - путем ежесуточного измерения ее площади с помощью прозрачной полиэтиленовой пленки с нанесенной на нее миллиметровой сеткой [1].

Результаты и обсуждение

Морфологические изменения кожи животных, которым раны наносились в состоянии нормотермии, приведены на рисунке 1. Как видно

из рисунка, через 1 сутки после нанесения раны эпидермис, непосредственно окружающий рану, формировал небольшой клин, который наползал на раневой дефект. Между кератиноцитами наблюдались межклеточные щели, что говорит о мобилизации клеток. Находящиеся под этим клином ткани содержали расширенные кровеносные сосуды, лишенные форменных элементов (рис. 1А). Через 3 сут после нанесения раны эпидермальный клин увеличивался в размерах и подрастал под лейкоцитарный вал (рис. 1Б). Кератиноциты имели слегка базофильную цитоплазму и крупные светлые ядра с 1-2 ядрышками. Под эпидермальным клином находилась богатая крове-

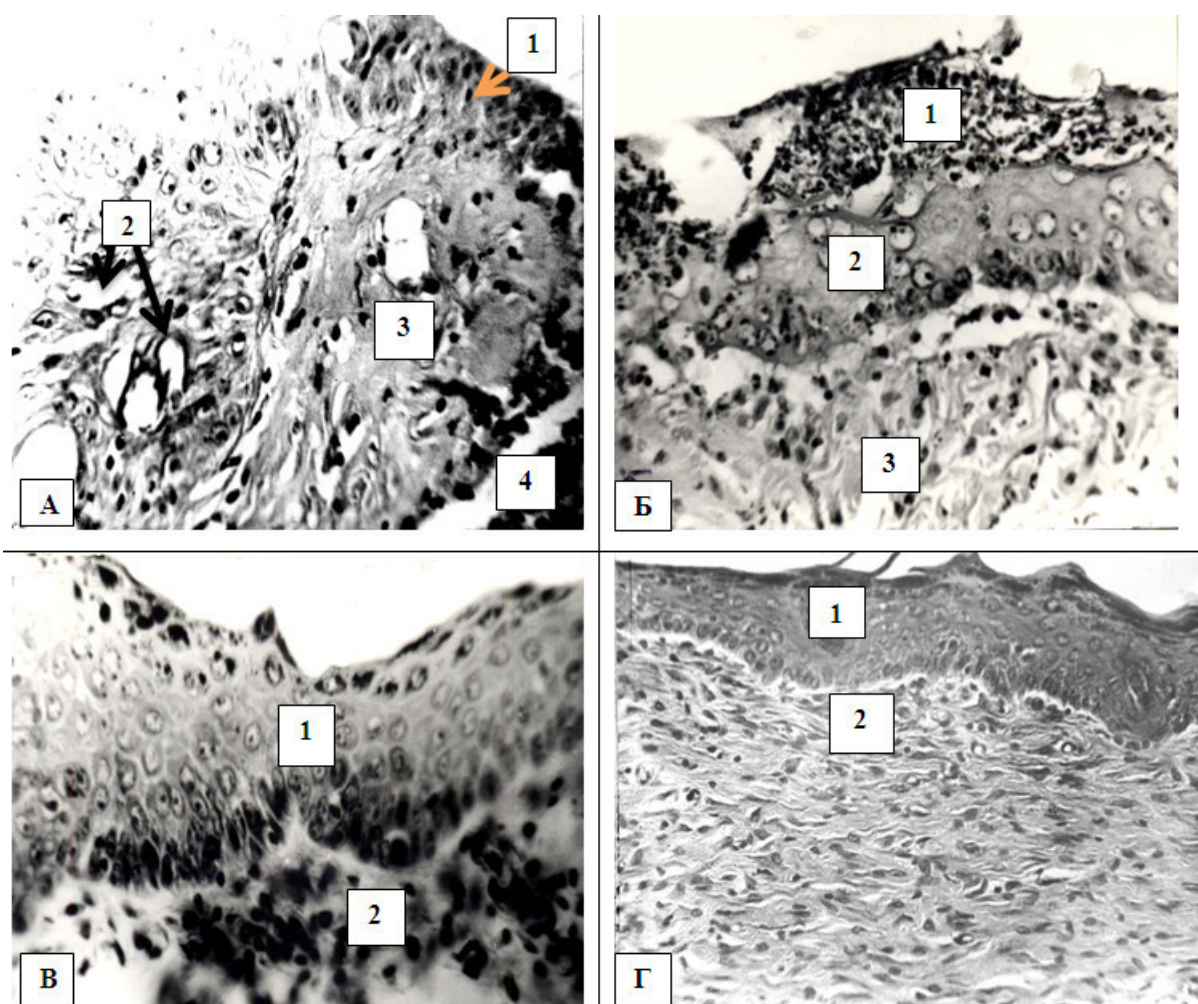


Рисунок 1 – Изменения в коже крыс при нанесении раны в условиях нормотермии. Гематоксилин и эозин. А-В – $\times 200$, Г – $\times 100$: А – через 1 сут после нанесения раны: 1 – эпидермальный клин, нарастающий на раневую поверхность; 2 – полости в эпидермисе, окружающем рану; 3 – грануляционная ткань с опустошенными сосудами; 4 – струп; Б – через 3 суток после нанесения раны: 1 – лейкоцитарный вал; 2 – эпидермальный клин, нарастающий на раневую поверхность; 3 – грануляционная ткань; В – через 5 сут после нанесения раны: 1 – эпидермис регенерата; 2 – грануляционная ткань, в которой преобладают лимфоциты; Г – через 15 сут после нанесения раны: 1 – эпидермис регенерата; 2 – рубцовая соединительная ткань регенерата.

носными микрососудами и клетками грануляционная ткань. В ней обнаруживались нейтрофилы, макрофаги, моноциты, адипоциты и немногочисленные фибробласты.

Через 5 сут эпидермис регенерата, закрывающий раневую поверхность, утолщался, происходила его дифференцировка: в нем появлялся зернистый слой. Однако роговой слой еще отсутствовал (рис. 1В). В отдельных участках эпидермис давал погружной рост в грануляционную ткань. В грануляционной ткани обнаруживалось значительное количество лимфоцитов и фибробластов. Через 10 и 15 сут дифференцировка эпидермиса регенерата была закончена, в нем появлялся выраженный роговой слой. К 15-м суткам граница эпидермиса с подлежащей дермой выравнивалась, в ней отсутствовал сосочковый слой и обнаруживались толстые коллагеновые волокна, характерные для рубцовой ткани. Клинья эпидермиса, погружавшиеся ранее в грануляционную ткань, исчезали. Формировался регенерат дермального типа (рис. 1Г).

При заживлении раны в условиях нормотермии в течение первых трех суток в эпидермисе, окружающей рану, и в эпителии регенерата кератиноциты с активностью ЩФ были немно-

численны. В это время фермент выявлялся в эпителии наружного корневого влагалища волосяного фолликула на границе с межфолликулярным эпидермисом, причем интенсивность окрашивания была максимальной.

Через 5 сут после нанесения раны в эпидермисе, непосредственно ее окружающем, появлялись фосфатазопозитивные клетки. Вначале эти клетки формировали один, а затем, на 7-е сутки наблюдения – 2-3 и более рядов (рис. 2А).

В эпителии наружных корневых влагалищ волосяных фолликулов фермент выявлялся через 5 суток после нанесения раны в основном на границе с межфолликулярным эпидермисом и характеризовался максимальным окрашиванием продукта реакции. В нижних же отделах волосяного фолликула наблюдались лишь небольшие очаги умеренного окрашивания, однако область волосяных луковицы (матрицы) и сосочка имела максимальную степень окрашивания продуктом ферментативной реакции, которое носило сливной характер, так что отдельно эти структуры нельзя было различить. Через 7 сут после нанесения раны распространенность максимальной позитивной реакции на фермент в наружном корневом влагалище волосяных фолликулов была

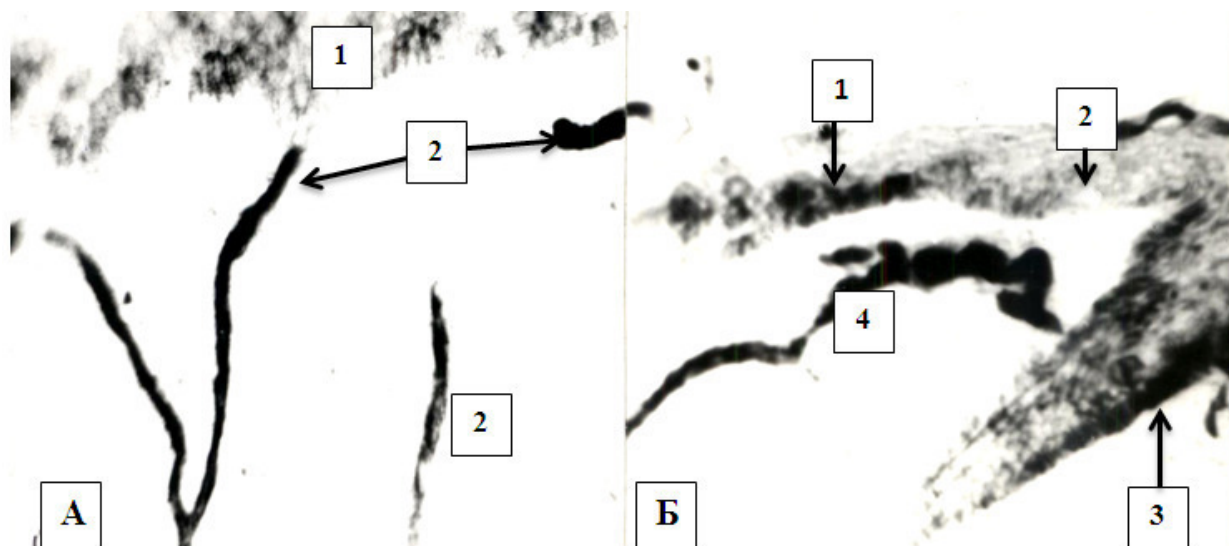


Рисунок 2 – Изменения ЩФ-позитивных стволовых клеток эпидермиса и волосяного фолликула крыс при нанесении раны кожи в условиях нормотермии. Реакция на щелочную фосфатазу. Метод Берстона. X200. А – фосфатазопозитивные стволовые и транзиторные клетки в эпидермисе кожи, непосредственно окружающей рану, через 7 сут после нанесения раны: 1 – эпидермис с фосфатазопозитивными СК и транзиторными клетками; 2 – фосфатазопозитивные кровеносные микрососуды; Б – фосфатазопозитивные стволовые клетки в эпидермисе и волосяном фолликуле кожи, окружающей рану, через 10 сут после нанесения раны: 1 – участок эпидермиса с фосфомоноэстеразоактивными клетками (СК); 2 – участок эпидермиса, в котором СК отсутствуют; 3 – максимальная активность ЩФ в утолщении (bulge) наружного корневого влагалища; 4 – ЩФ-позитивные микрососуды.

более выраженной, фермент выявлялся и в более дистальных отделах волосяного фолликула. Активность фермента в волосяных сосочках и луковицах по-прежнему была максимальной. В это время показатель скорости контракции раны был максимальным, существенно возрастала и интенсивность внеклеточного вставочного роста.

На 10-е сутки наблюдения у нормотермических животных эпителизация поверхности раны завершалась. В межфолликулярном эпидермисе кожи, окружающей рану, ЩФ выявлялась только в отдельных участках, причем эти участки сочетались с участками, где активность фермента была слабой или он не выявлялся (рис. 2Б). В наружных корневых влагалищах волосяных фолликулов активность фермента была еще высокой, в некоторых участках максимальной. Эти участки соответствуют области локализации bulge. В эпидермисе регенерата фермент выявлялся только в базальных кератиноцитах при его умеренной активности. К этому времени эпителизация раневой поверхности полностью завершалась, и СК bulge внесли в этот процесс, как свидетельствуют полученные данные, свой вклад.

После эпителизации раны интенсивность реакции постепенно снижалась как в эпидермисе регенерата и кожи, окружающей рану, так и в волосяных фолликулах, ее окружающих, а затем

она полностью отсутствовала.

У нормотермических крыс через 5 сут после нанесения раны наблюдалось также максимальное окрашивание тканей регенерата и струпа (рис. 3А). В дерме, окружающей кожу, в это время появлялось окрашивание внеклеточного матрикса (рис. 3Б). Оно имело относительно равномерный характер, умеренный синий цвет, в нем отсутствовали клетки. Окрашивание локализовалось вокруг кровеносных микрососудов микрососуды и волосяных фолликулов. По мере заживления раны объем и интенсивность окрашивания внеклеточного матрикса постепенно снижались, и к 15-20-м суткам оно отсутствовало.

Эпидермис краев раны, напоздающий на подлежащую под ним формирующуюся дерму регенерата, вначале давал в нее погружной рост. Вокруг этих врастающих в грануляционную ткань регенерата клиньев фосфоноэстеразопозитивного эпидермиса локализовались умеренно окрашенные очаги фосфоноэстеразопозитивного внеклеточного матрикса. Однако грануляционная ткань регенерата быстро подвергалась фиброзированию, и врастающие в соединительную ткань клинья эпидермиса исчезали вместе с фосфоноэстеразопозитивным внеклеточным матриксом.

У подвергнутых гипотермическому воздей-

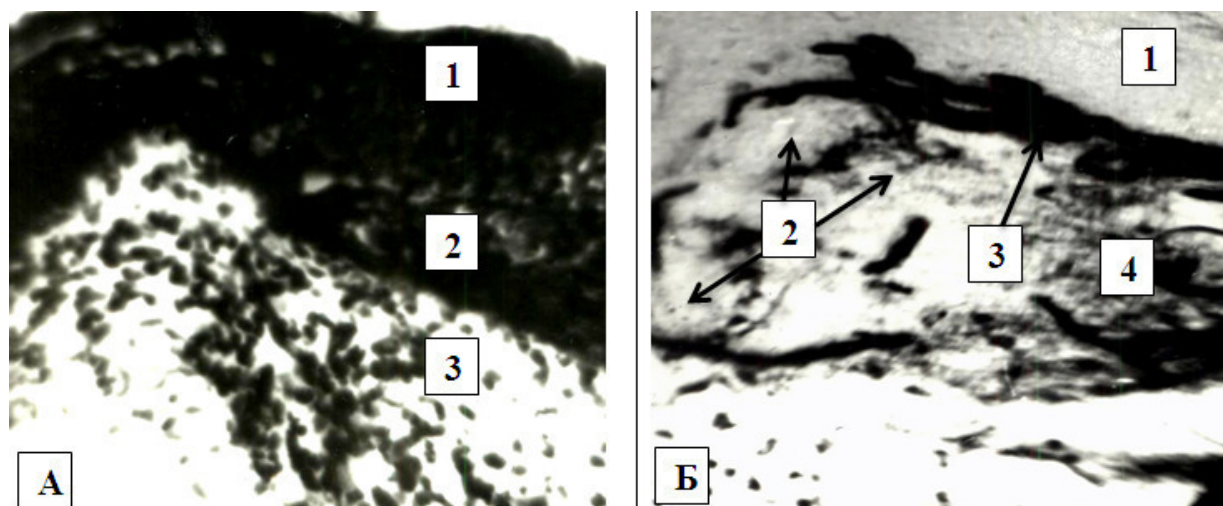


Рисунок 3 – Активность щелочной фосфоноэстеразы в струпе и эпидермисе, напоздающем на раневую поверхность (А), и в коже, непосредственно окружающей раневую поверхность (Б) через 5 сут после нанесения раны. Метод азосочетания по Берстону. $\times 200$. А: 1 – струп; 2 – эпидермальный клин, напоздающий на раневую поверхность; 3 – грануляционная ткань с фосфатазопозитивными нейтрофильными лейкоцитами и кровеносными микрососудами; Б – фосфоноэстеразопозитивный внеклеточный матрикс кожи, окружающей рану: 1 – эпидермис кожи; 2, 3 – ЩФ-позитивный матрикс с разной степенью активности фермента вокруг кровеносных микрососудов; 4 – ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс вблизи волосяного фолликула.

ствию животных наблюдалось существенное замедление течения раневого процесса (примерно на 3-5 сут, рис. 4). Грануляционная ткань формировалась медленно и отставала по темпам развития ее у животных, которым рана наносилась в условиях нормотермии.

Замедлялись контракция раны, интенсивность вне раневого вставочного роста. Из кожи, окружающей рану, формировался эпидермальный клин, который был инфильтрирован нейтрофилами (рис. 4А). Он был значительно меньше,

чем при нормотермии. Возможно, это мешало контракции раны, ее эпителизации и вне раневого вставочному росту в ранние сроки раневого процесса. В связи с таким отставанием эпителизация не завершалась полностью даже к 15-20-м суткам наблюдения.

В грануляционной ткани содержание клеток было снижено вплоть до 5-и суток наблюдения, при этом среди них было большое количество деформированных адипоцитов (рис. 4Б). Вместе с тем, к этому времени клин эпидермиса,

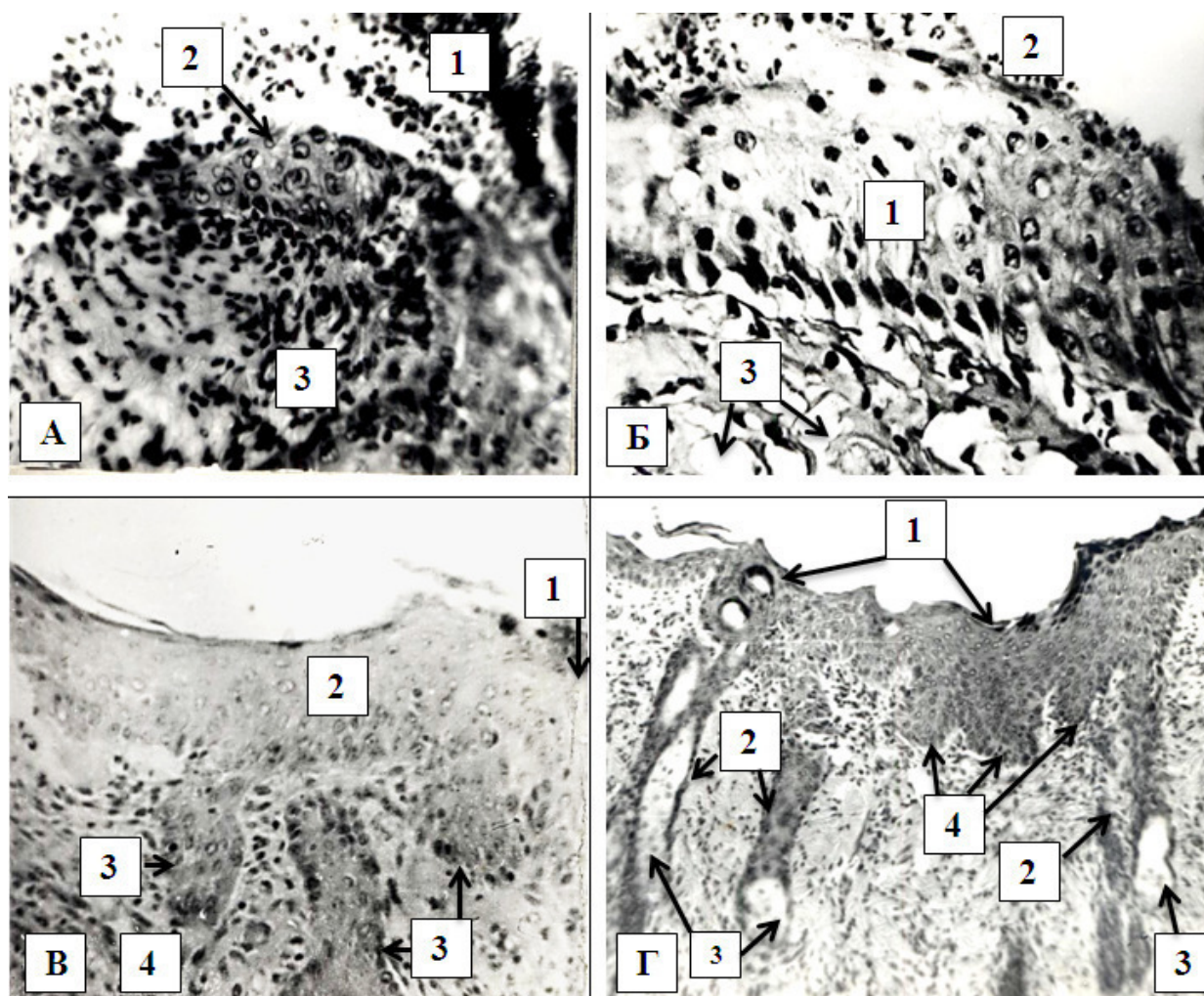


Рисунок 4 – Изменения в коже крыс при нанесении раны на фоне общей глубокой пролонгированной гипотермии. Гематоксилин и эозин. А-В – $\times 200$, Г – $\times 100$. А – через 3 сут, Б – через 5 сут, В – через 10 сут, Г – через 20 сут после нанесения раны. А: 1 – лейкоцитарный вал; 2 – эпидермальный клин, нарастающий на раневую поверхность; 3 – грануляционная ткань; Б: 1 – эпидермис, мигрирующий на раневую поверхность, с межклеточными промежутками между кератиноцитами и инфильтрированный нейтрофилами; 3 – грануляционная ткань, богатая адипоцитами; В: 1 – граница между эпидермисом кожи, окружающей рану, и эпидермисом регенерата; 2 – эпидермис регенерата; 3 – погружной рост эпидермиса регенерата в грануляционную ткань, содержащую небольшое количество клеток; Г: 1 – эпидермис регенерата, не завершившего дифференцировку (отсутствуют зернистый и роговой слои; расстояние между стрелками); 2 – вновь образованные волосные фолликулы; 3 – вновь образованные сальные железы; 4 – погружной рост недифференцированного эпидермиса в подлежащую дерму.

наползающего на поверхность раны, был достаточно выраженным (рис. 4Б). К 10-м суткам наблюдения в подлежащей грануляционной ткани уменьшалось количество нейтрофилов. Эпидермис регенерата формировал клинья, врастающие в подлежащую грануляционную ткань (рис. 4В).

Через 20 сут после нанесения повреждения зона повреждения у большинства животных была полностью эпителизирована, а струп отторгнут. Лишь у некоторых животных струп сохранялся. Во вновь образованном эпидермисе регенерата наблюдались небольшие участки с неполной его дифференцировкой – отсутствовали зернистый и роговой слои. В этих участках, очевидно, продолжалось образование волосяных фолликулов, во всяком случае, обнаруживались достаточно глубокие погружения эпителия в подлежащую дерму по типу плакод (рис. 4Г). Через 30 сут волосяной покров с салынными железами полностью восстанавливался, при этом внешне он выглядел более густым, чем на соседних участках кожи.

Через 5 сут после нанесения раны в кератиноцитах области утолщения (bulge) наружного корневого влагалища волосяного фолликула кожи, прилегающей к ране, наблюдалась максимальная активность ЩФ. Клетки из утолщения перемещались в сторону межфолликулярного эпидермиса, в кератиноцитах которого фермент вначале выявлялся в незначительном количестве. Здесь ЩФ-позитивные стволовые клетки еще были единичными, формировали небольшие скопления или отсутствовали. В препаратах выявлялись ЩФ-позитивные гемокапилляры. Вокруг волосяных фолликулов определялся ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс с низкой активностью фермента (рис. 5А).

Через 7 сут после нанесения раны ЩФ-позитивные клетки из области утолщения (bulge) наружных корневых влагалищ фолликулов кожи, окружающей рану, распространялись как в лежащие ниже утолщений участки влагалищ, так и в сторону межфолликулярного эпидермиса. Во всех указанных зонах активность ЩФ становилось максимальной, окрашивание на фермент носило сливной характер. В межфолликулярном эпидермисе ЩФ-позитивные клетки обнаруживались и в клетках шиповатого слоя. Максимальную активность в отношении ЩФ проявляли также гемомикрососуды дермы (рис. 5Б).

В струпе, покрывающем поверхность раны, через 1 сут после нанесения травмы активность ЩФ была низкой. Через 7 сут после травмирова-

ния в струпе и базальном слое эпидермиса формирующегося эпидермального клина регенерата определялась максимальная активность ЩФ. В это время в коже, окружающей рану, отмечалось резкое увеличение активности ЩФ. Это отмечалось не только в утолщении наружного корневого влагалища фолликулов, но и в межфолликулярном эпидермисе, а также в эпителии наружного корневого влагалища, находящемся дистальнее bulge. Внеклеточный матрикс в окружении волосяных фолликулов проявлял достаточно высокую активность фермента (рис. 5В, 5Г). Фермент выявлялся также в относительно немногочисленных нейтрофилах. Максимальная активность фермента определялась также в микрососудах дермы. В волосяных сосочках и эпителии волосяной луковицы волосяных фолликулов кожи, окружающей рану, определялась максимальная активность ЩФ, окрашивание на продукт реакции носило сливной характер, и невозможно было определить границу между этими структурами.

В последующие сроки наблюдения (10-20-сут) активность щелочной фосфомоноэстеразы оставалась по-прежнему высокой в межфолликулярном эпидермисе и в эпителии наружных корневых влагалищ волосяных фолликулов кожи, окружающей рану. Высокой также она была и в аналогичных структурах формирующихся волос. Существенное снижение активности фермента наблюдалось только к завершению эксперимента (через 30 сут после травмирования кожи).

Установленные в данном исследовании факты представляется возможным объяснить следующим образом. Основной задачей раневого процесса в коже является быстрее закрытие дефекта для предотвращения воздействия на организм вредных, в том числе и микробных факторов. Восстановление первоначальной структуры кожи при этом является второстепенным моментом, и организм от него просто-напросто отказывается, ускоренными темпами закрывая дефект. При этом регенеративный рост эпидермиса опережает таковой рост соединительной ткани. После закрытия дефекта происходит быстрое созревание грануляционной ткани регенерата с формированием соединительнотканного рубца. В свою очередь, образующаяся плотная рубцовая соединительная регенерата разрушает врастающие в грануляционную ткань в начале регенераторного процесса клинья наползающего на регенерат эпидермиса краев раны и отменяет возможность дальнейшего их развития и превра-

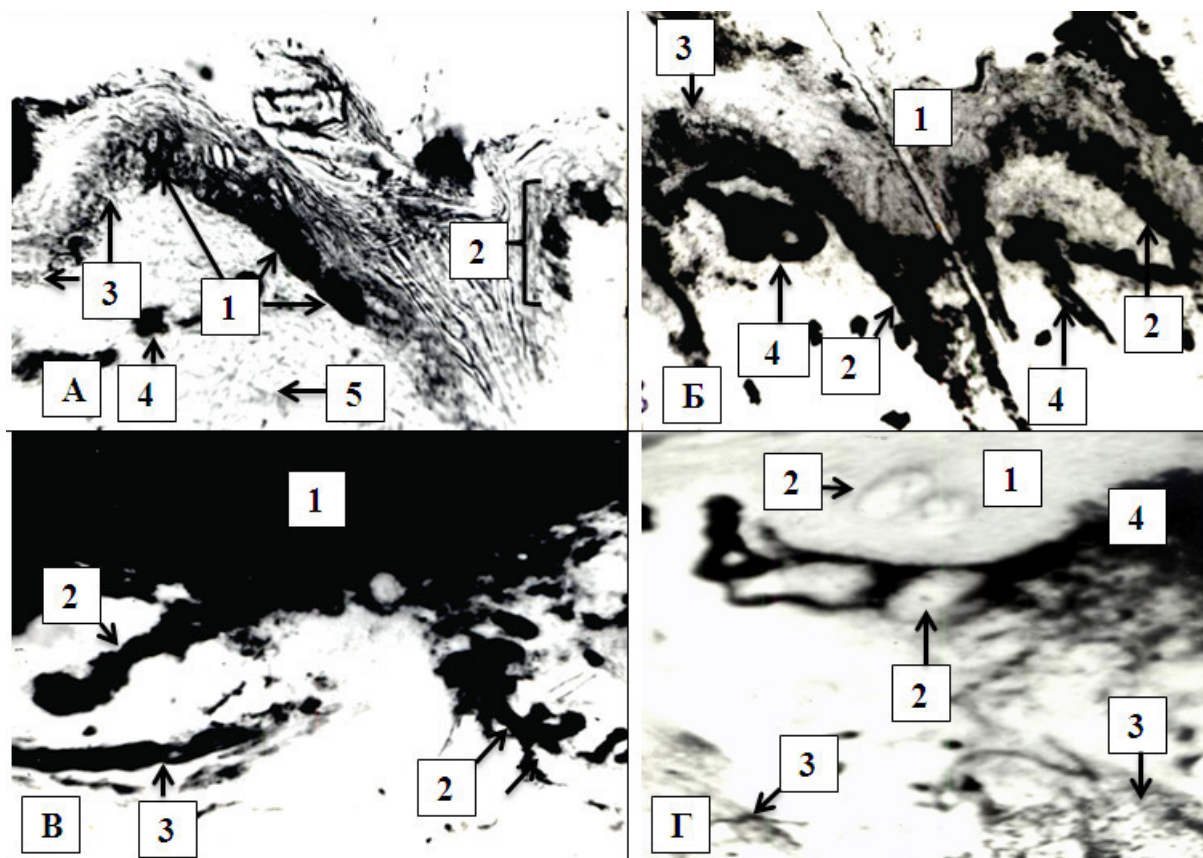


Рисунок 5 – Изменения в коже крыс активности ЩФ при нанесении раны на фоне общей глубокой пролонгированной гипотермии. Реакция Берстона на щелочную фосфоэстеразу. А, Б – х200, В, Г – х100. А – через 5 сут после нанесения раны: 1 – максимальная активность ЩФ в кератиноцитах области утолщения (bulge) наружного корневого волосяного фолликула кожи, прилегающей к ране, клетки которого перемещаются в сторону межфолликулярного эпителия (2); 3 – область межфолликулярного эпидермиса, где ЩФ-позитивные стволовые клетки еще единичны или отсутствуют; 4 – ЩФ-позитивные микрогемососуды; 5 – ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс с низкой активностью ЩФ;

Б – через 7 сут после нанесения раны: 1 – эпидермис кожи, окружающей рану; 2 – эпителий утолщения наружного корневого влагалища с максимальной активностью фермента; 3 – межфолликулярный эпидермис с максимальной активностью ЩФ; 4 – гемомикрососуды с максимальной активностью ЩФ;

В – кожа регенерата через 7 сут после нанесения травмы: 1 – максимальная активность ЩФ в струпе и базальном слое эпидермиса регенерата; 2 – погружной рост эпителия регенерата в грануляционную ткань со скудным клеточным составом; 3 – гемомикрососуд с максимальной активностью ЩФ;

Г – ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс вокруг формирующихся волосяных фолликулов регенерата через 20 сут после нанесения раны: 1 – эпидермис регенерата; 2 – поперечные срезы формирующихся волосяных фолликулов регенерата; 3 – ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс с умеренной активностью ЩФ; 4 – ЩФ-позитивный материал с максимальной активностью фермента.

щения в волосяные фолликулы. Это препятствует реализации полноценной регенерации кожи и формированию других органов общего покрова. В результате тканеспецифической регенерации формируется регенерат дермального типа.

При гипотермическом воздействии регенераторный процесс существенно замедляется. Это проявляется персистенцией грануляционной ткани и задержкой эпителизации. Далее первоначальная задержка регенерации сменяется актива-

цией морфогенетических процессов. Создаются условия для длительного пребывания эпидермиса в регенеративном состоянии с персистенцией фосфатазопозитивных стволовых клеток, которые не только восстанавливают межфолликулярный эпидермис, но и создают дериваты кожи. В ходе их образования наблюдается не только формирование волосяного покрова и сальных желез, но и своеобразная суперкомпенсация: волосяной покров оказывается более густым. Такая супер-

компенсация является свойством многих восстановительных процессов в других органах как проявление готовности к возможным повторным воздействиям стрессорных факторов (Л.Д. Лиознер, 1982).

В данной работе установлено окрашивание на щелочную фосфомоноэстеразу струпа, а также внеклеточного матрикса регенерата и дермы кожи, окружающей рану. Этот факт ранее в доступной литературе не обсуждался. Можно высказать следующие предположения в отношении его возникновения. Наличие ЩФ в струпе можно объяснить тем, что в нем, как известно, в большом количестве присутствуют нейтрофильные гранулоциты, прежде всего формирующие лейкоцитарный вал, в том числе и погибшие. Эти клетки содержат в своих гранулах щелочную фосфомоноэстеразу. При разрушении их ЩФ может выходить из клеток и давать положительную реакцию в лейкоцитарном вале и некоторое время в струпе. Такое же объяснение можно дать и положительной реакции на фермент грануляционной ткани регенерата, в которой в лейкоцитарную фазу воспалительного процесса существенно преобладают нейтрофильные лейкоциты.

Окрашивание внеклеточного матрикса вокруг ЩФ-позитивных волосяных фолликулов кожи, окружающей рану, и заново формирующихся волосяных фолликулов регенерата можно было бы аргументировать диффузией продукта ферментативной реакции из клеток во внеклеточный матрикс. Однако правомочна и другая точка зрения: в него диффундирует сама щелочная фосфомоноэстераза. Если это так, то данный факт можно расценить как адаптивно-компенсаторное явление, появляющееся в момент наиболее интенсивных морфогенетических процессов. В качестве подтверждения этой точки зрения можно привести данные И.А. Мучкаевой и соавт. (2014), которые указывают, что при культивировании стволовые клетки секретируют в культуральную среду щелочную и кислую фосфомоноэстеразы и другие факторы [13]. Щелочная фосфомоноэстераза является наиболее точным маркером стволовых клеток. Ее связывают с индуктивным действием на морфогенетические процессы. Поэтому в коже наибольшая экспрессия этого фермента определяется в раннем анагене. Он является индикатором индуктивного влияния дермального сосочка на прилежащие к нему клетки волосяной луковицы (матрицы), а также, возможно, аналогичного влияния на эпидермис и

эпителий волосяного фолликула различных регуляторных факторов, исходящих из подлежащей дермы. Однако в культуре клеток со временем многие белки, характерные для интактных клеток дермального сосочка, в том числе и щелочная фосфомоноэстераза, практически не определяются, и индукционный потенциал клеток исчезает. Это, очевидно, можно связать с изменением клеточного микроокружения в культуре ткани [13]. Наверное, эти факты можно экстраполировать и на ситуацию *in vivo*.

Одним из кандидатов на источник стволовых клеток кожи и, следовательно, щелочной фосфомоноэстеразы может являться белая жировая ткань (БелЖТ). В норме кожа является местом одного из самых крупных скоплений этой ткани, поскольку ею сформирован самый протяженный слой органа – гиподерма. Жировая ткань из гиподермы на значительном протяжении проникает и в дерму. Вокруг волосяных фолликулов, сальных и потовых желез (т.е. источников стволовых клеток) она образует мощные муфты.

Давно было показано (Н.Н. Аничков и соавт., 1951 и др.), что жировая ткань активно участвует в регенераторном процессе в коже. В ней первой появляются клетки воспалительного инфильтрата и тонкостенные кровеносные микрососуды. На основе этой ткани формируется грануляционная соединительная ткань, являющаяся морфогенетически активной тканью. В настоящем исследовании было показано, что большое количество жировых клеток (адипоцитов) находится под нарастающим на раневую поверхность эпидермисом у животных, которым рана наносилась в условиях воздействия пролонгированной глубокой гипотермии.

Содержание в жировой ткани взрослого человека стволовых клеток наибольшее по сравнению с другими их источниками. Так, в частности, в 1 см³ БелЖТ содержится в 100-1000 раз больше стволовых клеток, чем в том же объеме костного мозга. При трансплантации БелЖТ она оказывает на репаративные процессы в зоне трансплантации отчетливое стимулирующее влияние, обусловленное кумулятивным действием стволовых клеток, входящих в ее состав. Эта особенность стволовых клеток жировой ткани основывается на значительной эндокринной активности. Они продуцируют FGF (фактор роста фибробластов), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), TGFβ (трансформирующий фактор роста β), IGF (инсулиноподобный фактор роста), PDGF (тромбо-

цитарный фактор роста). Эти факторы способны стимулировать неоангиогенез и регенерацию адипоцитов [15]. Данное свойство жировой ткани в последнее время стали использовать для ее трансплантации с косметической целью.

В связи с вышесказанным, тесные структурные взаимоотношения эпидермального регенерата с жировой тканью можно, очевидно, считать не случайными: она как ткань, содержащая в большом количестве стволовые (стромальные) клетки, может оказывать на морфогенетические потенции регенерата посредством секреции ЩФ и перечисленных выше ростовых факторов стимулирующее влияние.

Kang S.K. и соавт. (2003) указывают, что дифференцировочные потенции СКЖТ достаточно широкие. Считается и доказано экспериментально, что эти клетки способны дифференцироваться не только в клетки мезенхимного происхождения (фибробласты, адипоциты, хондро- и остециты, гладкие миоциты), но и в клетки немезенхимного происхождения: нейроны, гепатоциты, панкреатоциты и кардиомиоциты [16]. Возможно, эти потенции распространяются и на кератиноциты.

В настоящее время показано, что стволовые клетки волосяного фолликула располагаются преимущественно не в области волосяной луковицы, а в области утолщения, выпуклости (англ. bulge) [17]. Это утолщение находится на уровне прикрепления к дермальному влагалищу волосяного фолликула мышцы, поднимающей волос, и образовано клетками наружного корневого влагалища. Показано, что в утолщении находится около 95% стволовых клеток волосяного фолликула и лишь 5% их находится в волосяной луковице (матриксе). По данным R.F. Oliver (1996), при удалении нижней трети волосяного фолликула матрикс формируется из верхней его трети, т.е. из bulge [18].

Было также показано, что при физиологической регенерации кожи стволовые клетки волосяного фолликула не участвуют в восстановлении межфолликулярного эпидермиса. Иная ситуация наблюдается при заживлении неглубоких кожных ран. В этом случае межфолликулярный эпителий восстанавливается за счет митотического деления и миграции на поверхность раны потомков стволовых клеток bulge эпителия наружного корневого влагалища фолликула. Эти клетки эпителизируют раневую поверхность, однако через несколько недель после заживления

раны их потомки из межфолликулярного эпителия исчезают. На основании этого авторами наблюдения [19] делают заключение, что для эпителиальных структур в коже существует популяция стволовых клеток, обладающих разными пролиферативными потенциями, причем наибольшими потенциями обладают клетки волосяного фолликула. Такими клетками являются клетки утолщения (bulge) [17]. Это же указывает на наличие в межфолликулярном эпидермисе собственных стволовых клеток [20].

В настоящем исследовании показано, что в обоих вариантах нанесения раны изменения в коже, окружающей рану, и в регенерате наблюдаются похожие изменения. Вначале активность ЩФ резко повышается в области утолщения наружного корневого влагалища волосяных фолликулов кожи вокруг раны. С течением времени наблюдается расширение области активации фермента как в сторону межфолликулярного эпидермиса, так и в дистальном направлении, в сторону волосяной луковицы. И, наконец, ферментсодержащие стволовые клетки появляются в эпидермисе регенерата. Разница заключается лишь в том, что, во-первых, при нанесении раны в условиях нормотермии ее заживление осуществлялось гистотипически, так как быстро сформировавшийся соединительнотканый рубец заблокировал все морфогенетические процессы, и дериваты эпидермиса не могли сформироваться. Контракция краев раны у этих животных осуществлялась быстро и интенсивно с резким пиком активности на 7-е сутки наблюдения. Это способствовало быстрой эпителизации раны. Уже через 1 сут после нанесения раны из участков кожи, непосредственно окружающих ее, формировался эпителиальный клин, который нарастал на раневую поверхность. В последующем он увеличивался в размерах и формировал небольшие участки погружного роста. Эти участки быстро исчезали, и эпителизация раневой поверхности завершалась к 10-м суткам. К этому же времени в основном происходило и завершение созревания рубцовой ткани. В эпителии регенерата, а также эпидермиса и волосяных фолликулов кожи, окружающей рану, выявлялась высокая активность ЩФ. При этом в эпителии наружного корневого влагалища участки с ЩФ-позитивными кератиноцитами были более распространенными и интенсивно окрашенными, чем в межфолликулярном эпителии. Это может означать, что эпителий волосяных фолликулов содержит ЩФ-позитивные

стволовые клетки, которые мигрируют в сторону межфолликулярного эпидермиса и затем эпителия регенерата, участвуя в эпителизации раны.

Согласно Р. Каур (2006), в межфолликулярном эпидермисе имеются собственные стволовые клетки, пролиферативные потенции которых уступают таковым у фолликулярных стволовых клеток [20]. Поэтому вполне возможно предположить, что СК bulge наружного корневого влагалища принимают участие (и более значительное, чем СК межфолликулярного эпидермиса) в формировании эпидермального клина, мигрирующего на раневую поверхность, и плакоды, из которой сформируются новые волосы. Вновь образовавшиеся волосяные фолликулы, очевидно, сами в последующем могут быть донорами СК для новых волосяных фолликулов. Можно предположить также, что СК межфолликулярного эпидермиса включаются в эпителизацию раневой поверхности раньше, но в меньшем объеме, чем СК волосяных фолликулов, окружающих рану.

При нанесении раны в условиях пролонгированной гипотермии наблюдалось резкое замедление заживления раны. Скорость ее контракции при этом значительно отставала от таковой у нормотермических животных. Полное закрытие раневой поверхности в основном завершалось к 20-м суткам наблюдения. По сравнению с нормотермическими крысами значительно запаздывало формирование грануляционной ткани и ее созревание. Поэтому эпидермальный пласт нарастал на молодую соединительную ткань. Это создавало условие для тесного и эффективного взаимодействия двух видов тканей разного происхождения в морфогенетических процессах.

Как показано в работе С.Е. Millar (2002), в эмбриогенезе развитие волосяного фолликула регулируется несколькими этапами эпителио-мезенхимных взаимодействий [21]. Под влиянием первого сигнала эпидермальные кератиноциты формируют плакodu волосяного фолликула. В дальнейшем паттерн расположения волос регулируется соотношением стимуляторов и ингибиторов фолликулогенеза. Взаимодействие между мезенхимой и эпидермальной плакодой управляет делением клеток как в плакоде, так и в мезенхиме. Это приводит к формированию дермального сосочка и вращанию тяжа эпителиальных клеток плакоды в дерму. Последующие сигналы, исходящие из формирующейся дермы, приводят к началу дифференцировки специализированных клеточных типов, а также к определению формы

волоса и его полярности.

Очевидно, нечто подобное происходит и во время формирования волос в регенерате при заживлении кожной раны, нанесенной в условиях действия на организм животных пролонгированной глубокой гипотермии. Как отмечал еще Л.Д. Лиознер (1982), регенераторный процесс имеет существенное сходство с эмбриональным гистогенезом. Для него также важны тесные взаимодействия с помощью медиаторов ткани эктодермального происхождения (эпидермиса) и мезенхимного происхождения (молодой соединительной ткани, какой является грануляционная ткань).

Заключение

1. Нанесение раны кожи на фоне пролонгированной глубокой гипотермии приводит к формированию регенерата кожного типа с восстановлением волос и сальных желез. Это связано с задержкой формирования грануляционной ткани, последующего замещения ее на зрелую соединительную ткань, угнетением воспалительной реакции и замедлением контракции раны.

2. В эпителизации поверхности раны и последующем формировании дериватов кожи ведущая роль принадлежит эпителию утолщения (bulge) наружных корневых влагалищ волосяных фолликулов кожи, окружающей рану. Вначале происходит увеличение количества активности ЩФ в стволовых клетках утолщения, а затем с течением времени они распространяются в сторону межфолликулярного эпителия, затем регенерата, а также дистально в направлении волосяной матрицы. В результате в межфолликулярном эпидермисе, ранее почти не содержащем ЩФ-позитивных клеток, они начинают выявляться и затем дают на всем протяжении резко позитивную реакцию на фермент.

3. Параллельно с активацией волосяных фолликулов кожи, окружающей рану, вокруг них появляется ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс. Источником ЩФ в нем могут быть резко ЩФ-позитивные микрососуды. Не исключается роль и клеток жировой ткани. Щелочная фосфомоноэстераза ЩФ-позитивного матрикса, очевидно, может содействовать органотипической регенерации кожи.

4. Органотипической регенерации кожи после нанесения раны наряду с персистенцией этой раны способствует характерная динамика ЩФ-

позитивных стволовых клеток фолликулов, межфолликулярного эпидермиса кожи, окружающей рану, и эпидермиса регенерата.

Литература

1. Ефимов, Е. А. Посттравматическая регенерация кожи / Е. А. Ефимов. – М., 1975. – 168 с.
2. Раны и раневая инфекция : рук. для врачей / под ред. Б. М. Костюченко, М. И. Кузина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1990. – 592 с.
3. Ефимов, Е. А. О возможности влияния механического фактора на полноту восстановления кожи на спине у крыс / Е. А. Ефимов, Т. В. Букина, В. Е. Кобзарь // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1988. – Т. 106, № 11. – С. 224–226.
4. Ефимов, Е. А. О перестройке регенератов дермального типа у крыс / Е. А. Ефимов, Т. В. Букина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1990. – Т. 110, № 10. – С. 432–434.
5. Мяделец, О. Д. Пролиферация, дифференцировка и апоптоз кератиноцитов эпидермиса при посттравматической регенерации кожи у крыс с различной реактивностью / О. Д. Мяделец // Онтогенез. – 1995. – № 1. – С. 54–61.
6. Мяделец, О. Д. Динамика популяции нейтрофильных лейкоцитов при заживлении кожной раны, нанесенной в условиях нормо- и гипотермии / О. Д. Мяделец, А. Ф. Суханов, Е. Ф. Пчельникова // Патол. физиология и эксперим. медицина. – 1993. – № 3. – С. 47–50.
7. Мяделец, О. Д. Морфофункциональные изменения в тромбоцитарном диффероне при заживлении кожной раны / О. Д. Мяделец, Е. Ф. Пчельников // Здравоохранение Беларуси. – 1992. – № 4. – С. 36–40.
8. Мяделец, О. Д. Изменения популяции макрофагов кожи и регионарного лимфоузла при заживлении кожных ран, нанесенных в условиях общей глубокой пролонгированной гипотермии / О. Д. Мяделец // Морфология. – 1994. – № 1/3. – С. 150–158.
9. Мяделец, О. Д. Исследование органотипической регенерации кожи при нанесении раны на фоне общей глубокой гипотермии организма / О. Д. Мяделец // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1993. – № 3. – С. 47–50.
10. Мяделец, О. Д. Исследование органотипической реге-

нерации кожи при нанесении раны на фоне общей глубокой гипотермии организма / О. Д. Мяделец // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1994. – № 2. – С. 33–36.

11. Системная компьютерная биология / под ред. В. А. Иванисенко [и др.]. – Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2008. – 769 с.
12. p63 identifies keratinocyte stem cells / G. Pellegrini [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001 Mar. – Vol. 98, N 6. – P. 3156–3161.
13. Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния / И. А. Мучкаева [и др.] // Acta Nature. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 48–57.
14. Борисов, В. А. Методика искусственной гипотермии на мелких лабораторных животных / В. А. Борисов, О. Д. Мяделец, В. Н. Бринкевич // Кробиология. – 1989. – № 4. – С. 49–50.
15. Парфенова, Е. В. Стромальные клетки жировой ткани: молекулярная характеристика, антигенные свойства и перспективы использования для терапии сердечно-сосудистых заболеваний / Е. В. Парфенова, Д. О. Трактеев, В. А. Ткачук // Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. – М. : Медицина, 2009. – Т. 2. – С. 4–35.
16. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats / S. K. Kang [et al.] // Exp. Neurol. – 2003 Oct. – Vol. 183, N 2. – P. 355–366.
17. Cotsarelis, G. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis / G. Cotsarelis, T. T. Sun, R. M. Lavker // Cell. – 1990 Jun. – Vol. 61, N 7. – P. 1329–1337.
18. Oliver, R. F. Histological studies of whisker regeneration in the hooded rat / R. F. Oliver // J. Embryol. Exp. Morphol. – 1996 Oct. – Vol. 16, N 2. – P. 231–244.
19. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis / M. Ito [et al.] // Nat. Med. – 2005 Dec. – Vol. 11, N 12. – P. 1351–1354.
20. Kaur, P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential / P. Kaur // J. Invest. Dermatol. – 2006 Jul. – Vol. 126, N 7. – P. 1450–1458.
21. Millar, S. E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development / S. E. Millar // Invest. Dermatol. – 2002 Feb. – Vol. 118, N 2. – P. 216–225.

Поступила 10.04.2018 г.

Принята в печать 31.05.2018 г.

References

1. Efimov EA. Post-traumatic regeneration of the skin Moscow, RF; 1975. 168 p. (In Russ.)
2. Kostyuchenok BM, Kuzin MI, red. Wounds and wound infection: ruk dlia vrachei. 2-e izd pererab i dop. Moscow, RF: Meditsina; 1990. 592 p. (In Russ.)
3. Efimov EA, Bukina TV, Kobzar' VE. On the influence of mechanical factor on the completeness of recovery of the skin on the back of rats. Biul Eksperim Biologii Meditsiny. 1988;106(11):224-6. (In Russ.)
4. Efimov EA, Bukina TV. On restructuring of dermal-type

regenerates in rats. Biul Eksperim Biologii Meditsiny. 1990;110(10):432-4. (In Russ.)

5. Myadelets OD. Proliferation, differentiation and apoptosis of epidermal keratinocytes in post-traumatic skin regeneration in rats with different reactivity. Ontogenez. 1995;(1):54-61. (In Russ.)
6. Myadelets OD, Sukhanov AF, Pchel'nikova EF. The dynamics of a population of neutrophils in the healing of skin wounds in conditions of normo - and hypothermia. Patol Fiziologii Eksperim Meditsina. 1993;(3):47-50. (In Russ.)
7. Myadelets OD, Pchel'nikov EF. Morphofunctional changes

- in the platelet differon in the healing of skin wounds. *Zdravookhranenie Belarusi*. 1992;(4):36-40. (In Russ.)
8. Myadelets OD. Changes in the population of skin macrophages and regional lymph node in the healing of skin wounds inflicted in the conditions of General deep prolonged hypothermia. *Morfologiya*. 1994;(1-3):150-8. (In Russ.)
9. Myadelets OD. Study of organotypic regeneration of the skin when applying the wound on the background of the General deep hypothermia of the body. *Patol Fiziologiya Eksperim Terapiya*. 1993;(3):47-50. (In Russ.)
10. Myadelets OD. Study of organotypic regeneration of the skin when applying the wound on the background of the General deep hypothermia of the body. *Patol Fiziologiya Eksperim Terapiya*. 1994;(2):33-6. (In Russ.)
11. Ivanisenko VA, Likhoshvay VA, Kolchanov NA, Goncharov SS, red. System computer biology. Novosibirsk, RF: Izd-vo SO RAN; 2008. 769 p. (In Russ.)
12. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar;98(6):3156-61.
13. Muchkaeva IA, Dashinimaev EB, Artyukhov AS, Myagkova EP, Vorotelyak EA, Egorov EE, i dr. Reprogramming of human dermal papilla cells to pluripotent state. *Acta Nature*. 2014;6(1):48-57. (In Russ.)
14. Borisov VA, Myadelets OD, Brinkevich VN. Methods of artificial hypothermia in small laboratory animals. *Kriobiologiya*. 1989;(4):49-50. (In Russ.)
15. Parfenova EV, Traktuev DO, Tkachuk VA. Adipose tissue stromal cells: molecular characteristics, antigenic properties and prospects for use in the treatment of cardiovascular diseases. V: Pal'tsev MA, red. *Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii*. Moscow, RF: Meditsina; 2009. T 2. P. 4-35. (In Russ.)
16. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):355-66.
17. Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*. 1990 Jun;61(7):1329-37.
18. Oliver RF. Histological studies of whisker regeneration in the hooded rat. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Oct;16(2):231-44.
19. Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*. 2005 Dec;11(12):1351-4. Epub 2005 Nov 20. doi: 10.1038/nm1328
20. Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol*. 2006 Jul;126(7):1450-8. doi: 10.1038/sj.jid.5700184
21. Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*. 2002 Feb;118(2):216-25. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01670.x

Submitted 10.04.2018

Accepted 31.05.2018

Сведения об авторах:

Мяделец О.Д. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Витебский государственный медицинский университет;

Лебедева Е.И. – к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Витебский государственный медицинский университет;

Мяделец Н.Я. – преподаватель гистологии и генетики, Витебский государственный медицинский колледж.

Information about authors:

Myadelets O.D. – Doctor of Medical Sciences, professor; head of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Lebedeva E.I. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Myadelets N.Y. – lecturer of histology and genetics, Vitebsk State Medical College.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии. E-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Лебедева Елена Ивановна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Histology, Cytology & Embryology. E-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Elena I. Lebedeva.